第1卷第4期　　动物学研究　　Vol 1., NO. 4
1980年11月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Nov., 1980

小鼠网织细胞腹水瘤染色体的研究

郭健民　刘瑞清　张耀平　丁琳华

（中国科学院昆明动物研究所）

摘　要

本文首次报告了我国建立的小鼠实验肿瘤模型网织细胞腹水瘤（Ascites reticulum-cell sarcoma，简称ARS）的核型及带型分析结果。ARS是超二倍体肿瘤，染色体众数为44（37.7%）。发现有七条标记染色体。文中着重描述了ARS染色体的形态学特征，G带和C带分布以及核仁组织者区(NORs)的定位。

网织细胞腹水瘤（Ascites reticulum-cell sarcoma，简称ARS）是网织细胞肉瘤L_I的腹水型肿瘤，系中国医学科学院于1959年建立的小鼠实验肿瘤模型〔杨简等，1964〕，现已广泛地用作肿瘤学研究材料。ARS的生长特性和细胞形态学特征，已有详细的描述，但其细胞遗传学研究，迄今未见报道。我们对ARS进行了详细的核型和带型分析，现将结果报道如下。

材料与方法

ARS肿瘤引自中国医科院简阳分院。肿瘤宿主为本所繁养的非纯系小白鼠，体重18—20克，腹腔接种传代，在本所保种一年之久。

肿瘤染色体标本的制备。采用在宿主生长七天的腹水细胞制备染色体标本。给小鼠腹腔注射秋水仙素，剂量7微克／克体重，经2.5小时，抽取腹水0.2毫升，用生理盐水洗涤，800转／分离心10分钟，弃去上清液。加6—8毫升0.4%KCl溶液37℃低渗15分钟。然后用甲醇——冰醋酸（3:1）固定30分钟，第二次固定置于4℃过夜。空气干燥法制备染色体标本。

标本用磷酸盐缓冲液稀释的Giemsa染液（1:10，pH 6.8）染色30分钟，蒸馏水冲洗，空气干燥。选择染色体分散良好的中期细胞作核型分析。本实验共观察5只宿主小鼠，每只小鼠约分析50个中期细胞。

G分带技术。参照Seabright(1971)〔Seabright，1971〕的方法。标本经37℃ 0.025%胰酶（Difco，1:250）溶液处理4分钟，蒸馏水冲洗，Giemsa染液（1:10，pH 6.8）染色30分钟。选取10个染色体显带优良的中期细胞进行G带分析。

C分带技术。按Sumner（1972）〔Sumner，1972〕的BSG—C程序进行，稍有修改。

本文于1980年2月15日收到。

用22℃ 0.2N HCl 处理标本1小时，蒸馏水冲洗，然后在50℃的5%的氢氧化钡〔$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$〕溶液中处理15分钟，蒸馏水冲净玻片上沉淀的氢氧化钡，60℃ 2×SSC温育1小时。Giemsa 染液（1:10，pH 6.8）染色30分钟。

Ag—AS 染色法（银染法）。参照Goodpasture等（1975）和施立明等（1979）的方法，在标本上滴加4—6滴50%$AgNO_3$溶液，盖上一张擦镜纸，置于铺有潮湿滤纸的培养皿内，65℃保温12小时，用蒸馏水冲洗，干燥。滴加2—3滴9%中性福尔马林和等量的氨银液（10毫升蒸馏水＋8克$AgNO_3$＋10毫升氨水，pH12—13）复以盖片，在显微镜下观察，当染色体呈现金黄色，着丝点染成深棕色时即用蒸馏水冲洗，干燥。

结 果 和 讨 论

一、ARS染色体的数目

实验共观察了220个中期细胞。表和图1指出，ARS染色体数目分布范围很广，从35到98。参考斯德哥尔摩人类细胞遗传学命名法国际体制（ISCN，1978）的标准，亚二倍体细胞(2n－)占2.3%，假二倍体(2n＝40)占5.5%，超二倍体（2n＋）占85.5%，近三倍体（3n±）占1.9%，近四倍体（4n±）占3.7%，亚五倍体（5n－)占1.4%。所观察的细胞绝大多数是超二倍体（$2n \pm \frac{n}{2}$），染色体数目是41—49，其中43条染色体的细胞占12.7%，44条者占37.7%，45条者占11.4%。

众所周知，染色体的非整倍体性是肿瘤的主要特征之一，许多因素（宿主年龄，肿瘤年龄，接种技术，环境条件等）都会影响肿瘤染色体产生变异。本实验结果表明，ARS是超二倍体肿瘤，染色体的众数为44，FN＝45。

二、ARS的标记染色体

通过核型分析，我们发现ARS有七种大小形态互不相同的标记染色体，其他染色体均为近端着丝点染色体（图版Ⅰ）。这七种标记染色体分别命名为M1，M2，M3，M4，M5，M6，M7。M_1是近端着丝点染色体，臂的中间部位有一条不太明显的次缢痕；M_2是最大的一条近端着丝点染色体；M_3染色体中部有一明显细长的主缢痕，经C带处理，Ag—AS染色均可证明是双着丝点染色体；M4染色体的形态似花瓶状，中等大小；M_5略小于M4，在着丝点一端具有一柄状物；M6和M7为微小染色体。

表和图2表明，具有完整一组标记染色体即M1—M7的细胞占27.7%具M1M3M4M5M6M7的细胞占21.4%，具M3M4M5M6M7者占10.9%，具M2M3M4M5M6M7者占9.1%。染色体众数44，具有M1—M7标记染色体的细胞占观察细胞的13.6%（30／220）。可见，这种类型的细胞是ARS肿瘤的干系（Stemline）。

除此之外，我们还看到亚中着丝点染色体,C分带具双着丝点，占0.27%(6／220)。Kaziwara〔1954〕，Sasaki〔1974〕在ELD肿瘤中观察到亚中着丝点染色体，Sasaki作了Q带和G带分析后认为亚中着丝点染色体是B标记染色体长臂末端断裂丢失所形成的，

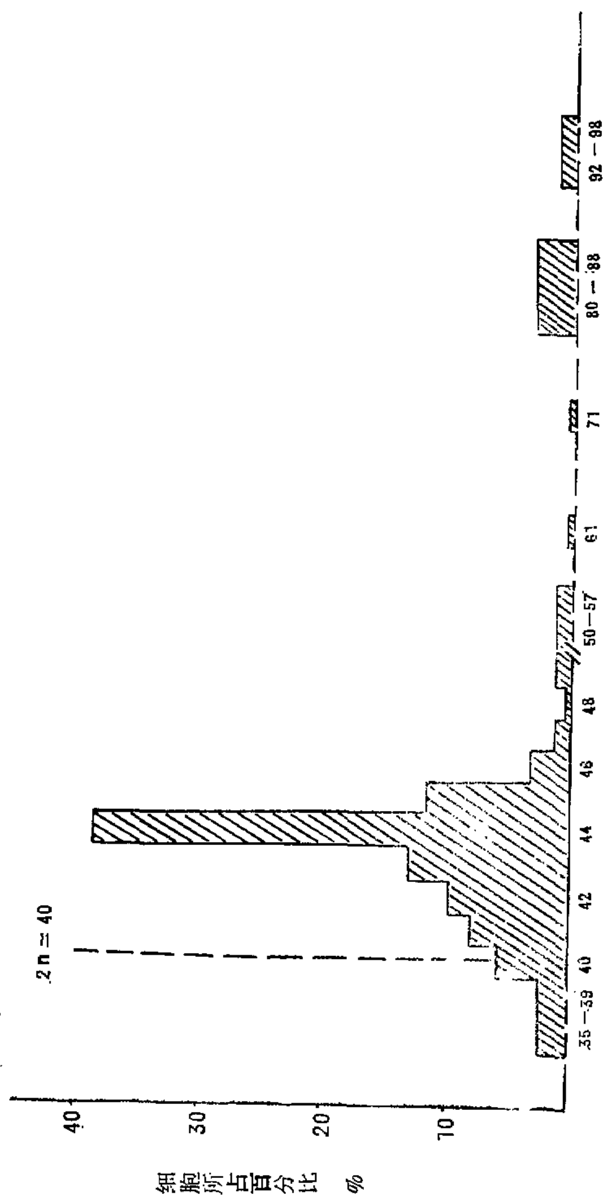


图 1．小鼠网织细胞腹水瘤染色体数目的分布

Fig. 1. The distribution of chromosomal number of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse.

表 小鼠网织细胞腹水瘤染色体数目及标记染色体组合

Table. The chromosomal number and the combination of chromosomes of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse

标记染色体组合 \ 染色体数目	35—39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50—57	61	71	80—88	92—98	总数	%
$M_1M_2M_3M_4M_5M_6M_7$	1	1	2	8	8	30	8	1	1	1							61	27.7
$M_1\ \ M_3M_4M_5M_6M_7$	1	1	3	4	8	21	6	1	1		1						47	21.4
$M_2M_3M_4M_5M_6M_7$		2	1	1	4	8	1	1				2					20	9.1
$M_3M_4M_5M_6M_7$	1	1	2	4	3	9	3	1									24	10.9
$M_1M_2M_3M_4M_5M_6$	1		1														2	0.9
$M_1M_2M_3M_4\ \ M_6M_7$		1				2	1										4	1.8
$M_1M_2M_3M_4M_5M_6 2M_7$							1					1					2	0.9
$2(M_1M_2M_3M_4M_5M_6M_7)$															4	2	6	2.7
其他类型	1	6	8	4	5	13	5	3	1		2		1	1	3	1	54	24.5
总数	5	12	17	21	28	83	25	7	3	1	3	3	1	1	7	3	220	
%	2.3	5.5	7.7	9.5	12.7	37.7	11.4	3.2	1.4	0.5	1.4	1.4	0.5	0.5	3.2	1.4		

同样，也有人在S180肿瘤中看到亚中着丝点染色体。由此推断，ARS的亚中着丝点染色体可能是M3由于某一臂末端断裂形成的畸变染色体。有些作者把S180，ELD肿瘤的最大的近端着丝点染色体C划为标记染色体，而另一些作者不把C算作标记染色体。在ARS中M2是最大的近端着丝点染色体，单个存在，不配对，所以我们把M2算作标记染色体。由于划分标准不统一，如何更准确地识别标记染色体，仍是值得进一步研究的问题。

三、ARS染色体的G带

实验共分析了10个42—45条染色体的G带图象（图版Ⅱ）。结果表明，所有近端着丝点染色体的着丝点区均显现深带，臂上的带纹数目最多的有6条深带，7条浅带，最少者仅有一条浅带。按其带纹，有的染色体可以配对，有的甚难配对。

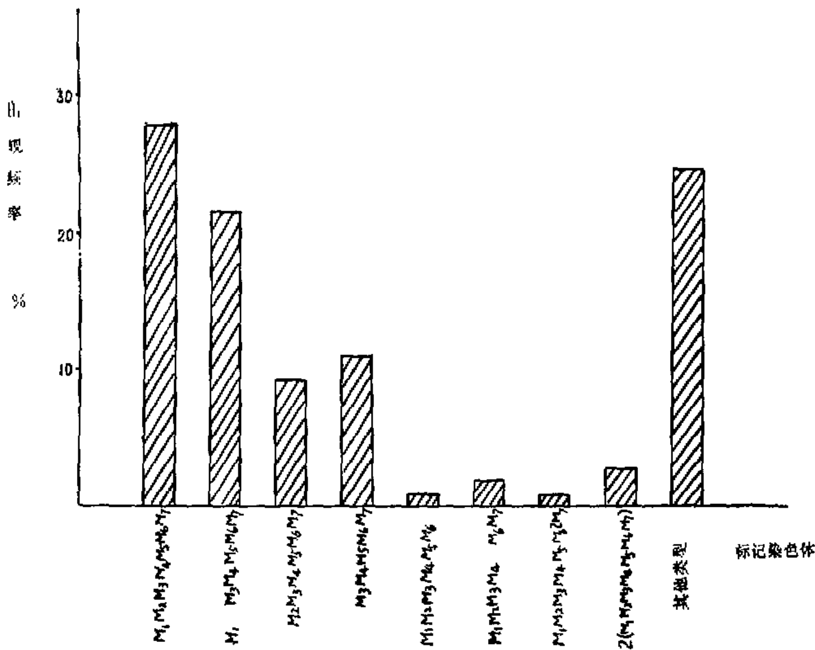


图2．小鼠网织细胞腹水瘤标记染色体组合及出现频率

Fig. 2. The combination and frequency of marker chromosomes of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse.

本文着重描述标记染色体的G带带型。按ISCN体制〔1978〕制定的人类染色体标准，可以把ARS的标记染色体划分为以下的区带（图3）：

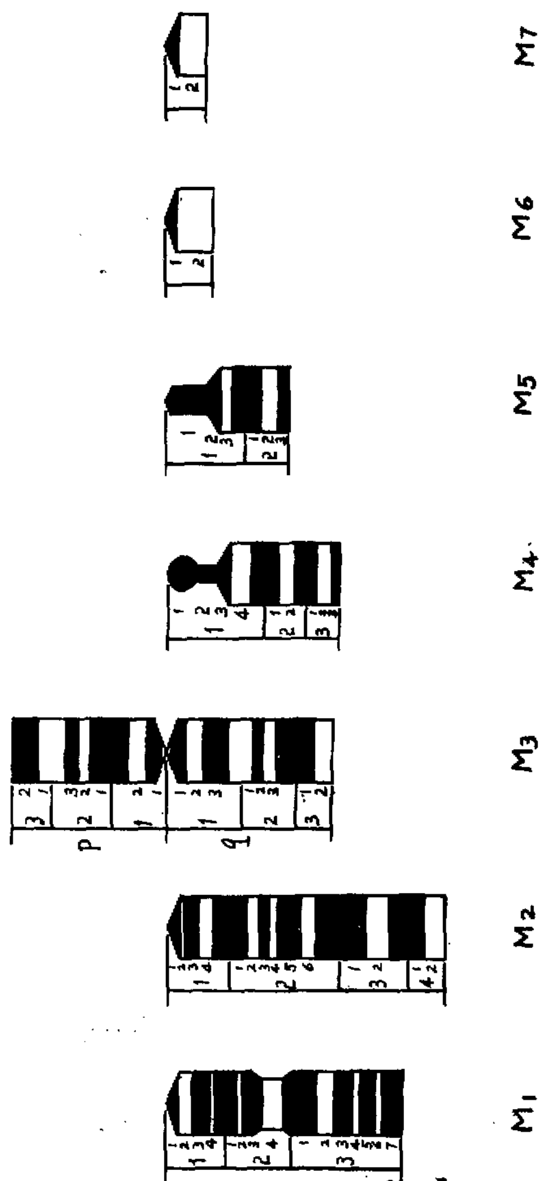


图3．小鼠网织细胞腹水瘤标记染色体G带模式图

Fig. 3. G-banding idiogram of marker chromosomes of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse.

M1染色体以着丝点——宽深带——次缢痕——末端为界标分为三个区：1区有4条带，一条深带，两条浅带，着丝点为深带；2区4条带，两条深带，一条浅带，次缢痕为浅带；3区7条带，三条深带，三条浅带，末端为深带。

M2染色体以着丝点——次宽深带——最宽深带——次宽深带——末端为界标分为四个区：1区有4条带，一条深带，两条浅带，着丝点为深带；2区6条带，三条深带，三条浅带；3区2条带，一条最宽的深带，一条浅带；4区2条带，一条深带，末端为浅带。

M3染色体以末端——p（短臂）宽浅带——p宽深带——着丝点——q（长臂）宽浅带——q宽深带——末端为界标分为六个区：p1区有2条带，一条深带，一条浅带；p2区3条带，一条宽深带，一条深带，一条浅带；p3区2条带，一条浅带，末端为深带；q1区3条带，两条深带，一条浅带；q2区3条带，一条深带，两条浅带；q3区2条带，一条很宽的深带，末端为浅带。M3染色体的着丝点中部有一条很狭窄的非染色区域。

M4染色体呈“花瓶状”，以“瓶口”部位——宽深带——次宽深带——末端为界标分为三个区：1区有4条带，“瓶口”膨大部分和“瓶颈”均为深带，此外还有一条深带和一条浅带；2区2条带，一条宽深带，一条浅带；3区3条带，一条深带，一条浅带，末端为细窄的深带。

M5染色体有一柄状物，以柄端——宽深带——末端为界标可分为两个区：1区有3条带，一条深带，一条浅带，柄状物为深带；2区3条带，一条宽深带，一条浅带，末端为深带。

M6和M7皆分为一区2条带，着丝点为深带，臂为浅带。

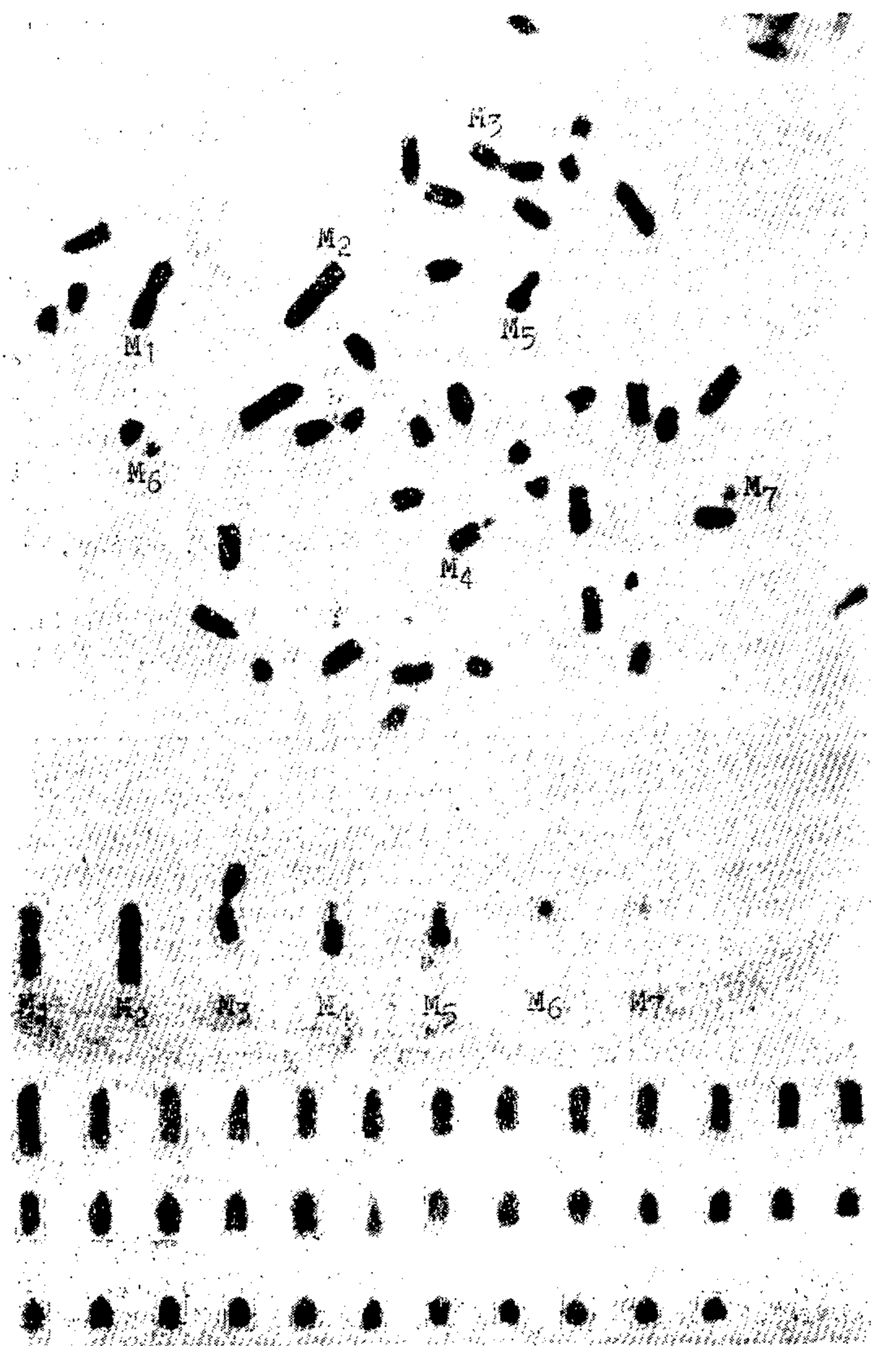
四、ARS染色体的C带

ARS染色体经C带处理后，所有的着丝点部位均显示深带。M3染色体的着丝点区域有两条清晰的C带，中间有一条很狭窄的非染色区(图版Ⅲ)。说明ARS的M3也和S180，ELD，L1的双着丝点标记染色体一样，是遗传上稳定的双着丝点染色体〔郭健民等，1979〕，其形成机制可能是一种特殊的罗伯逊融合（Robertsonian fusion），当其两条近端着丝点染色体的短臂发生断裂，同时又相互融合，产生不对称性易位，形成一条具有双着丝点的染色体。为什么这种双着丝点在小鼠不同类型肿瘤中频繁出现呢？这是尚待深入研究的有趣问题。

M4的“瓶颈”和M5的柄状物都染成深色粗大的C带，说明在这些部位浓聚着丰富的结构异染色质。

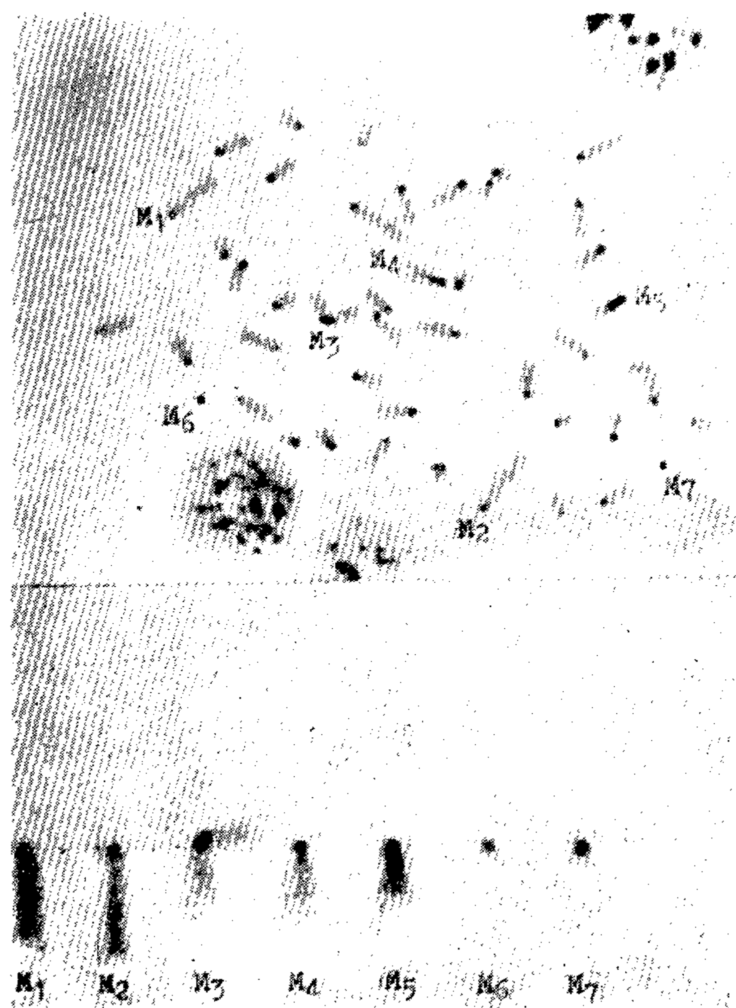
五、ARS染色体的Ag—AS染色

现已证明〔Goodpasture，1975；Dev，1977〕，核仁组织者区（简称NORs）分布有18S＋28S rRNA的密码基因r DNA，近来采用Ag—AS氨银染色法可以清楚地显示出NORs的位置。施立明等（1979）发现小鼠Ehrlish腹水瘤，淋巴1号，肉瘤180腹水瘤NORs的数量，分布位置以及活性与正常小鼠相比有明显不同。在ARS肿瘤中也看到这种现象（图版Ⅳ）。我们采用的非纯系昆明种小白鼠骨髓染色体的NORs有3－6个，

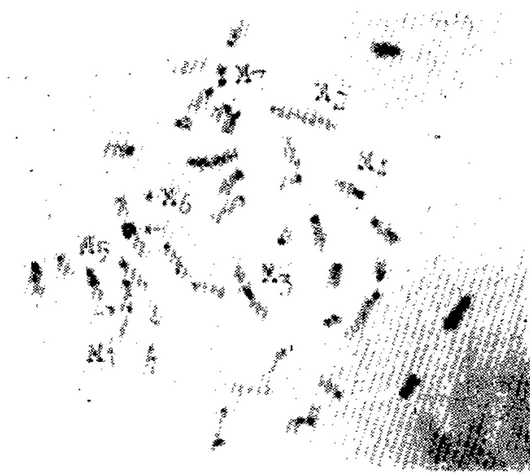

M3
M2
M1
M5
M6
M7
M4
M1
M2
M3
M4
M5
M6
M7



图版Ⅱ



图版Ⅱ



图版Ⅳ

图版Ⅰ. 小鼠网织细胞腹水瘤的核型

Fig. Ⅰ. The karyotype of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse.

染色体众数44, M_1—M_7为标记染色体

Modal number of chromosomes is 44, M_1—M_7 are marker chromosomes.

图版Ⅱ. 小鼠网织细胞腹水瘤染色体的G带

Fig. Ⅱ. G-banding patterns of chromosomes of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse.

染色体众数44.

Chromosomal number is 44.

图版Ⅲ. 小鼠网织细胞腹水瘤染色体的C带

Fig. Ⅲ. C-banding patterns of chromosomes of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse.

染色体众数44.

Chromosomal number is 44.

图版Ⅳ. 小鼠网织细胞腹水瘤染色体的Ag-AS图象

Fig. Ⅳ. Metaphase plate of ascites reticulum-cell sarcoma in mouse by Ag-AS staining technique.

染色体众数45, M_1-M_7为标记染色体, 箭头示核仁组织者区(NORs).

Chromosomal number is 45, M_1-M_7 are marker chromosomes; arrows indicate nucleolus organizer regions (NORs).

其位置在长臂上紧靠着丝点〔施立明等，1979〕而ARS的NORs仅有两个，一个在一条中等大小的近端着丝点染色体的长臂靠近着丝点部位，呈黑色粗大的团块，另一个在M1标记染色体的次缢痕上，呈黑色的小园点。

Denton等（1977）指出，Ag—AS染色对NORs有特异性，而且可兼染着丝点。ARS的M3标记染色体的主缢痕显出两条深棕色的Ag带，中间有一条很狭窄的非染色区，从而进一步证明M3是一条双着丝点染色体。

结 论

1．ARS是超二倍体肿瘤，染色体众数为44（37.7%），FN=45。有七条形态不同的标记染色体。干系核型：染色体数目为44，具有M1—M7一组完整的标记染色体组合，占13.6%。

2．G分带结果表明，M1可分为三个区，依次具有4，4，7条带；M2可分为四个区，分别具有4，6，2，2条带；M3短臂上有三个区，依次具有2，3，2条带，长臂上分为三个区，依次具有3，3，2条带；M4可分为三个区，依次具有4，2，3条带；M5分为二个区，依次具有3，3条带；M6和M7分别为一区2条带。

3．C带和Ag—AS染色证明，M3标记染色体是一条双着丝点染色体。ARS的NORs有两个，分布在M1标记染色体次缢痕部位和一条中等大小染色体的长臂上靠近着丝点部位。

参 考 文 献

郭健民等，1979，自然杂志，2(7):409—410.

施立明等，1979，科学通报，24(2):93—96.

杨 简等，1964，中华病理学杂志，8(7):59—63.

An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, 1978, *Cytogenet. Cell Genet.*, 21(6):371—774.

Denton,T.E.et al.,1977,Stain Technol.,52(6):311—313.

Dev,V.G.et al.,1977,*Genetics*,86(2):389—398.

Goodpasture,C.et al., 1975, *Chromosoma (Berl.)*, 53(1):37—50.

Kaziwara,K.,1954,*Cancer Res.*,14(11):795—801.

Sasaki,M.et al.,1974,*J.nat.Cancer Inst.*,52(4):1307—1315.

Seabright,M.,1972,*Lancet* II(7731):971—972.

Sumner,A.T., 1972, *Exp. Cell Res.*, 75(1):304—306.

THE CHROMOSOMAL STUDY ON THE ASCITES RETICULUM-CELL SARCOMA IN MOUSE

Guo Jian-min Liu Rui-qing Zhang Yao-ping and Ding Lin-hua

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica, Kunming*)

Abstract

This is the first paper to report the observations of the karyotype and banding patterns of the cell of ascites reticulum-cell sarcoma (ARS) in mouse, which has been established in our country. ARS is a hyperdiploid tumor. Modal number of the chromosomes is 44 (37.7%). Seven marker chromosomes were discovered. Morphological characteristics, the distributions of G- and C-bands and the location of nucleolus organizer regions (NORs) of the tumor chromosomes were described in detail.